RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XI N. 3 - Settembre 1950

INFESTAZIONE DA *BRACHYLAEMUS SUIS* (BALOZET, 1936) IN SUINI DELLA PROVINCIA DI FOGGIA

Dott. PAOLO SAVI
Veterinario Provinciale, Bergamo

In alcuni allevamenti della Provincia di Foggia, durante gli anni 1947 e 1948, furono rilevate interessanti infestazioni a carattere ricorrente dovute ad un trematode identificato come *Brachylaemus suis* Balozet, 1936.

L'infestazione, particolarmente intensa ed imponente nei giovani soggetti, deve ritenersi, allo stato delle osservazioni fatte, scarsamente diffusa e limitata a pochi allevamenti e perchè l'autopsia condotta su centinaia di suini dei diversi branchi della zona non aveva mai messo in evidenza il parassita e perchè l'affezione non era conosciuta dai veterinari locali.

Il reperto è, tuttavia, di un certo interesse in quanto l'infestazione da trematodi del genere *Brachylaemus* nella specie suina non risultava finora segnalata in Europa, l'unica segnalazione che precede la presente essendo infatti, quella di Balozet che, in Tunisia, appunto nel maiale, trovò e descrisse *Brachylaemus suis*.

E' da notare che condizioni ambientali e sistemi di allevamento illustrati dal Balozet si ripetono, sotto molti aspetti, per quei gruppi di suini che sono stati rinvenuti parassitati nella zona di Foggia. Si tratta in entrambi i casi, di branchi di maiali che sfruttano largamente le risorse naturali di pascoli spontanei sui quali è costante la presenza di piccoli gasteropodi del gen. *Helix*. E' stato inoltre osservato che le località ove pascolavano i suini parassitati erano pure contemporaneamente intensamente infestate da arvicole.

Le caratteristiche morfologiche e biologiche del parassita da noi repertato corrispondono perfettamente a quelle descritte da Balozet, alle cui precise e dettagliate descrizioni per più ampi particolari pertanto rimandiamo. Si tratta di un trematode allungato, linguiforme, lievemente appiattito, translucido, percorso longitudinalmente da una linea nerastra; la lunghezza varia

da 2 a 4 mm., a seconda che si trovi in stato di contrazione o di rilassamento,mentre la larghezza è di 0,4-0,6 mm. Ospiti intermedi sono gasteropodi della famiglia *Helicidae*, gen. *Helix*; ospite definitivo è il suino. Balozet è tuttavia riuscito ad infestare sperimentalmente numerose altre specie animali (coniglio, topo, ratto, piccione, ecc.).

Nell'ospite definitivo *Br. suis* si localizza in corrispondenza dell'intestino tenue che si presenta con note di modica enterite e ripieno, a partire dal suo terzo medio e fino ad una decina di centimetri dalla valvola ileo-cecale, di una sostanza densa, vischiosa, filante, di color bruno-cioccolato frammezzo la quale si distinguono, a migliaia, gli esemplari di *Br. suis* in gran parte fissati sulla mucosa intestinale mediante le due ventose orale e ventrale.

Clinicamente l'affezione si presenta coi segni di una profonda anemia ed è caratterizzata da un intenso dimagramento dei soggetti colpiti.

Secondo le nostre osservazioni, collimanti con quelle di Balozet, sono colpiti in maniera apprezzabile solo suinetti in giovane età, dai 50 ai 90 giorni.

L'azione patogena di *Br. suis* si esplica attraverso le innumeri piccole sottrazioni di sangue compiute, di continuo, dalle molte migliaia di parassiti affondati nella parete intestinale ed è in diretto rapporto con il numero dei parassiti ospitati nel tenue.

Se è vero che la profonda anemia e, in buona parte, le pessime condizioni di nutrizione devono ascriversi all'azione specifica spoliatrice del parassita, è, però, sempre da ricercare altrove un'altra causa preesistente e predisponente che, indebolendo le difese naturali dell'organismo e disturbandone il normale equilibrio giustifichi la presenza dell'enorme numero di parassiti.

Nei branchi nei quali è stata messa in evidenza un'infestazione massiva da *Br. suis* erano state, infatti, in precedenza riscontrate ricorrenze di peste suina e di paratifo, ed i sistemi di allevamento non erano fra i più razionali. Ed era il perdurare di una notevole mortalità, anche quando gli appropriati interventi specifici avrebbero dovuto fare escludere, come causa determinante di morte, le infezioni combattute, che imponeva, ogni volta, la attenta ricerca del nuovo agente cui attribuire le perdite continuate. Ed in realtà nè il quadro clinico, nè quello anatomo patologico erano mai quelli caratteristici della peste suina e del paratifo, mentre erano invece evidenti le manifestazioni e le lesioni riferibili all'azione spoliatrice di *Br. suis*.

Ad analoghe considerazioni è condotto il Balozet che nei frequenti focolai della Tunisia affida al parassita solo un ruolo secondario.

L'infestazione, in Puglia come in Tunisia, ha carattere stagionale, presentandosi con gravità notevole nel periodo che va dall'autunno alla primavera, in relazione al ciclo biologico degli ospiti intermedi.

Il trattamento dei suini infestati è stato tentato con vari antielmintici:

kamala, timolo, estratto molle di piretro, estratto etereo di felce maschio, essenza di trementina, tetracloruro di carbonio. I risultati non poterono essere che modesti poichè non fu possibile nè impedire le reinfestazioni nè cambiare i sistemi di allevamento.

Difficoltà di ordine pratico ed economico si oppongono, altresì, ad una azione efficiente di profilassi. Infatti, solo la messa a coltura dei pascoli infestati ne assicurerebbe la bonifica. La stessa loro rotazione, che comporterebbe l'allontamento dei suini per lunghi periodi, non interromperebbe in pratica il ciclo del parassita data la probabile presenza di altri ospiti definitivi quali i piccoli roditori selvatici.

Resta, rimedio tuttavia più che efficace, l'adozione di un più razionale sistema di allevamento dei suini che allontani o rimuova, con appropriata alimentazione e misure profilattiche, quelle carenze e quelle infezioni che predispongono all'insediarsi dell'infestazione da *Br. suis* e ne favoriscono il prevalere.

RIASSUNTO

L'A. descrive episodi di infestazione dei suini da *Brachylaemus suis* Balozet, 1936, per la prima volta citato in Europa, riscontrati in Puglia, provincia di Foggia, negli anni 1947 e 1948.

RESUME

L'A. décrit des épisodes d'infestation des porcins par *Brachylaemus suis* Balozet, 1936, rencontrés en Province de Foggia, dans les années 1947 et 1948. La présente c'est la première citation du parasite pour l'Europe.

SUMMARY

The Author describes cases of swine infestation by *Brachylaemus suis* Balozet, 1936, in Puglia, provincie of Foggia, in the years 1947 and 1948. This is the first record of thispecies in Europe.

BIBLIOGRAFIA

Balozet L. (1936). Sur un *Brachylaemus* de l'intestin du porc - *Bull. Ac. Vétér. France*, IX, 93.

Balozet L. (1937). Cycle évolutif de *Brachylaemus suis* L. B. 1936 - *C. R. Ac. Soc.*, CCIV, 622.

Balozet L. (1937). *Brachylaemus suis* mihi 1936, Trémetode de l'intestin du porc. Rôle pathogène et cycle évolutif - *Arch. Ist. Pasteur Tunis*, XXVI, 36.

Dawes Ben (1946). The Trematoda-Cambridge Un. Press, 366, 412; 476.

Dollfus R. Ph. (1934). Sur quelques *Brachylaemus* de la faune française recoltés principalement a Richelieu (Indre et Loire) - *Ann. de Parasit.* XII, 551.

DOLLFUS R. PH. (1935). Sur quelques *Brachylaemus* de la faune française recoltés principalement a Richelieu (Indre et Loire) - *Ann. de Parasit.*, XIII, 52.

JOYEUX CH., BAER J. G., TIMON-DAVID (1932). Recherches sur le cycle évolutif des Trématodes appartenents au genre *Brachylaemus* Dujardin (syn. *Harmostomum* Braun) - *C. R. Ac. Soc.*, CXCV, 972.

JOYEUX CH., BAER J. G., TIMON-DAVID (1934). Recherches sur les Trématodes du genre *Brachylaemus* Dujardin (syn. Harmostomum Braun) - *Bull. Biol. France et Belgique*, LXVIII, 385.

NEVEU-LEMAIRE M. (1936). Traité d'Helmintologie médicale et vétérinaire - Vigot Frères ed. - Paris, 217 e segg.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XI N. 3 - Settembre 1950

STUDI SUGLI *STYLOCEPHALIDAE* (*SPOROZOA*) III - FECONDITÀ DEI PARASSITI E GRADO DI INFEZIONE DEI LORO OSPITI *

ALESSANDRO FILIPPONI

Istituto Superiore di Sanità

Laboratorio di Parassitologia. — Capo: Prof. A. Missiroli

Scopo della presente nota è quello di definire, da un punto di vista quantitativo, le caratteristiche di un'infezione da Stilocefalidi e di determinarne le cause responsabili.

I dati appresso riportati si riferiscono prevalentemente ad un'unica specie, *Stylocephalus gigas* Filipponi 1949, che può essere presa, anche sotto questo punto di vista, come tipica rappresentante di tale gruppo di Sporozoi.

L'indagine comprende i seguenti punti: 1) valutazione della fecondità del parassita, mediante computo delle oocisti derivate da un'unica coppia gamontica; 2) esame del grado di infezione presentato da lotti di ospiti di provenienza diversa; 3) individuazione di alcuni fattori favorevoli e sfavorevoli alla propagazione del parassita; 4) analisi delle combinazioni dei vari fattori e caratteristiche fondamentali di un'infezione da Stilocefalidi.

1. — Fecondità del parassita.

Ad eccezione dei dati riferiti da Weschenfelder (1938) relativi ad *Actinocephalus parvus* non esistono, per quanto mi consta, in tutta la bibliografia delle Gregarine altri ragguagli precisi circa il numero di oocisti derivate da un'unica coppia gamontica, limitandosi gli AA. ad espressioni generiche.

---

* Le esperienze sono state eseguite in parte presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Roma.

Il conteggio è stato eseguito sulle oocisti provenienti da una gamontocisti di *Stilocephalus gigas* di 1014 μ di diametro. Poichè il valore medio di tale grandezza in un campione sufficientemente rappresentativo di *S. gigas* è di μ 856,87132 ± 2,402 con valori minimi di 600 μ e valori massimi di 1080 μ, la gamontocisti in questione dev'essere considerata piuttosto grande ma non massima.

La gamontocisti appena sporificata è stata immersa in una goccia di olio di oliva. Tale accorgimento si è dimostrato utilissimo, eliminando il pericolo della perdita delle oocisti durante le manipolazioni per il conteggio. Operando al binoculare da dissezione, si distaccavano con microspilli brevi frammenti di catenelle oocistiche della lunghezza di 100-200 μ. Ciascuno di questi frammenti veniva quindi posto su vetrino portaoggetto su cui si era spalmata una piccola goccia di olio, e le singole oocisti venivano contate direttamente al microscopio ad un ingrandimento opportuno. *

Il numero delle oocisti è risultato pari a 93.972. L'approssimazione può considerarsi dell'ordine di grandezza di 100 unità. Poichè la lunghezza media delle oocisti è di μ 15,876574 ± 0,00703, la catena di oocisti ** raggiunge la sorprendente lunghezza di circa m. 1,50. Contenendo ogni oocisti 8 sporozoiti, un insetto ingerendo il contenuto di una tale gamontocisti introdurrà all'incirca 800.000 parassiti.

Il numero di oocisti in gamontocisti di diverso volume, già ad una semplice valutazione ad occhio appare differente. Per ragioni comprensibili si è dovuto rinunciare ad un controllo numerico. Del resto WESCHENFENDER (1938) su materiale meno prolifico, *Actinocephalus parvus*, aveva già dimostrato che il numero di oocisti è « grosso modo » proporzionale al volume della gamontocisti (474 oocisti per una gamontocisti di 62 μ di diametro,

---

* Il metodo per sè dà la massima garanzia, limitando le cause di errore unicamente alle condizioni di stanchezza dell'operatore. Ad evitarle si operava per circa mezz'ora al giorno. Il conteggio si è protratto per oltre due mesi ed è stato possibile soltanto grazie alla collaborazione del Dott. MARIA D'AMBROSI, che qui vivamente ringrazio.

** La catena oocistica è avvolta a spirale. Tuttavia dipanandola non si ottiene un unico filamento, in quanto di tratto in tratto una stessa gocciolina di sostanza cementante tien saldate non due ma quattro oocisti. Ne risulta, districando il groviglio di oocisti, un complesso di anse, di solito molto ampie, ma a volte più ristrette in modo da assumere l'aspetto di piccoli anelli.

GRELL (1940), a proposito delle catene oocistiche di *S. longicollis* sostiene trattarsi « un einen Spiralfaden und nicht, wie LÉGER angibt, um Einzelfäden und geschlossene Ringe ». In realtà, a me sembra, LÉGER (1904) afferma fondamentalmente la stessa cosa da me constatata. Dice infatti « la chaîne s'incurve et forme une hélice ou parfois même un anneau ». In sostanza il filamento è a spirale ma poichè ripetutamente s'interseca, nei punti di incrocio si salda. Come caso limite la saldatura può avvenire tra le oocisti corrispondenti di due spirali consecutive; da qui derivano gli anelli.

1902 oocisti per una gamontocisti di 112 μ di diametro). Inoltre, per quanto riguarda *S. gigas*, avendo messo in evidenza (FILIPPONI 1950) che non esiste correlazione tra volume delle gamontocisti e dimensioni delle oocisti, è verisimile che una certa correlazione debba esistere invece tra volume della gamontocisti e numero delle oocisti.

Il conteggio delle oocisti ci permette anche di valutare il numero di divisioni progamiche. Poichè $2^{17} > 83.972 > 2^{16}$ sia per il gamonte ♀ che per il gamonte ♂ bisogna ammettere almeno 17 divisioni. Lo scarto tra il numero di oocisti prodottesi e quello dei gameti teoricamente prevedibile ($2^{17} = 151072$) può trovare spiegazione nel fatto che non tutti i gameti si sono copulati. È noto infatti (LÉGER 1904; GRELL 1940) che negli Stilocefalidi si formano due sorta di androgameti, gli uni fertili, gli altri, meno abbondanti dei primi, sterili. Evidentemente, anche nel caso che nei gamonti dei due sessi (i quali erano all'incirca delle stesse dimensioni) si fosse verificato un egual numero di divisioni progamiche, il numero degli zigoti possibili sarebbe stato limitato dal numero di androgameti fertili.

2. — GRADO DI INFEZIONE DELL'OSPITE.

Quantitativamente due *elementi* possiamo distinguere in una infezione: la *frequenza* e l'*intensità*.

Allo scopo di valutare l'entità dell'una e dell'altra sono state effettuate le seguenti osservazioni ed esperienze.

1. - Trenta esemplari di *Blaps gigas*, catturati nel settembre 1948 in una cantina di Castel S. Pietro (Lazio) furono sacrificati subito dopo la cattura ed i loro intestini dissezionati. Solo 7 erano infetti ed il numero dei parassiti presenti in ciascuno di essi, tutti riferibili a *S. gigas*, oscillava da poche unità ad un centinaio.

2. - Nel Marzo dell'anno successivo nella stalla di una casa colonica non molto distante dalla precedente località furono raccolti 42 esemplari dell'ospite. Il lotto fu diviso in due gruppi di 21 individui. Il primo fu trattato come nel primo caso. Tutti gli esemplari risultarono abbondantemente parassitati, ciascuno con un numero di Stilocefalidi non inferiore al centinaio e spesso di molto superiore. I parassiti si presentavano a gruppetti di grandezze ed età differenti, tra loro discontinue, corrispondenti a distinte ingestioni di oocisti. Il secondo gruppo di insetti fu invece posto in gabbia di raccolta (FILIPPONI 1949) e le gamontocisti emesse controllate accuratamente fino ad esaurimento. * Furono raccolte complessivamente 300 ga-

---

* Le ultime gamontocisti furono emesse dopo 7 mesi. Essendo assolutamente da escludersi la possibilità di reinfezione nella gabbia di raccolta, bisogna ammettere che lo sviluppo trofico in *S. gigas* possa protrarsi anche per un periodo superiore a 7 mesi.

montocisti di *S. gigas* con un numero medio quindi di 15 gamontocisti per ospite (cioè 30 coppie gamontiche). Poichè la scelta degli individui per la separazione nei due gruppi era stata fatta a caso, è presumibile che inizialmente gli esemplari del secondo gruppo possedessero eguale frequenza ed intensità di quella constatata direttamente nel primo gruppo. Il numero



Fig. 1 — Sezione trasversa di intestino medio di *Blaps gigas* infetto da *S. gigas*. L'ospite contiene soltanto gamonti prossimi a incistarsi. (40 x).

più basso di parassiti rivenuti in questo secondo caso fa dunque supporre che molti di essi, a parte l'eventuale disparità tra i due sessi presenti nello stesso ospite, periscano prima di raggiungere la maturità sessuale.

3. - Un lotto di 15 esemplari rinvenuti contemporaneamente ai precedenti in un'altra stalla della stessa zona presentavano un'infezione mista. Dopo sei mesi gli insetti avevano deposto 90 gamontocisti di *S. gigas* e 66 gamontocisti di *S. reticulatus*.

4. - Nel dicembre 1949 furono catturati al Colosseo (Roma) 110 esemplari di *Blaps gigas* e posti in gabbia di raccolta. In 5 mesi sono state complessivamente raccolte 520 gamontocisti di *S. reticulatus* e solo 15 gamontocisti di *S. gigas*.

5. - Da un androne sito al 10° km. dell'Appia antica, appartenente ai ruderi di una antica villa romana ed attualmente adibito a ricovero occasionale di animali domestici, furono raccolti a più riprese nel corso di due anni un centinaio di esemplari di *Blaps gigas*. Nessuno di essi apparve mai infetto da Stilocefalidi.

6. - Infine alcuni esemplari di *Blaps gigas* furono infettati sperimentalmente. Dopo qualche giorno di digiuno, ciascun insetto veniva isolato e costretto a mangiar un pezzettino di mela contaminato con i filamenti oocistici di tre diverse gamontocisti di *S. gigas* (all'incirca 1.500.000 parassiti). Si controllava che l'ingestione fosse completa. Ciò fu ripetuto di settimana in settimana per 10 volte consecutive, con un complesso quindi di 15 milioni di parassiti ingeriti. A tempi diversi dall'ultima ingestione i singoli insetti furono sacrificati ed i loro intestini in parte inclusi, in parte dissezionati per un esame diretto. Il *mesenteron* di questi insetti per almeno tre quarti era letteralmente infarcito di parassiti delle varie età con un complesso valutabile ad alcune migliaia. Un numero quindi enormemente superiore a quello in ogni caso riscontrato in natura, ma anche di gran lunga inferiore al numero di parassiti ingeriti.

Dalle osservazioni ed esperienze riferite possiamo dedurre le seguenti constatazioni.

1. - La frequenza di infezione varia moltissimo a seconda della località di provenienza dei lotti esaminati, potendo raggiungere in alcuni casi la totalità degli individui.

2. - Parimenti estremamente fluttuante si presenta l'intensità di infezione nei singoli individui infetti. Il numero medio più frequente è dell'ordine di alcune centinaia. Mediante infezione sperimentale si possono raggiungere alcune migliaia senza compromettere la vitalità dell'ospite.

3. - L'*omopoliparassitismo* è una condizione normale. Solo in tre casi tra le molte centinaia di *Blaps gigas* dissezionate mi è occorso di osservare un unico gamonte in esemplari mantenuti in gabbia di raccolta. Si trattava però evidentemente di individui che si erano già scaricati degli altri parassiti e cui era stato d'altro canto preclusa la possibilità di reinfettarsi.

4. - Esistono in natura lotti di *Blaps gigas* esclusivamente infetti da *S. gigas*, altri infetti soltanto da *S. reticulatus*, altri ad infezione mista con prevalenza dell'una o dell'altra specie o con rapporti pressochè identici tra le due specie. Infine esistono lotti completamente indenni da Stilocefalidi, sebbene provengano da località situate in vicinanza di altre infette.

5. - Molti parassiti vengono eliminati prima che raggiungano la maturità sessuale.

6. - Gli insetti infetti presentano in genere gruppi di parassiti di varie età tra loro discontinue corrispondenti ai diversi intervalli di tempo

intercorsi tra una ingestione e l'altra di oocisti, i quali sono ovviamente regolati dal puro caso.

3. — Fattori favorevoli e sfavorevoli alla propagazione del parassita.

Poichè l'infezione da Stilocefalidi viene contratta mediante ingestione di oocisti da parte dell'ospite, si tratta nel nostro caso di una *propagazione* puramente *passiva*. Quali cause entrano in gioco nel determinare una distribuzione del parassita così varia qual'è quella risultata dall'analisi del paragrafo precedente?

(1) *Fattori favorevoli.*

Esiste un primo fattore biologico favorevole alla propagazione del parassita ed è la sua prodigiosa fecondità. Il numero di oocisti prodotto da un'unica coppia gamontica di *S. gigas* non rappresenta soltanto il caso di massima fecondità fin'ora segnalato per le Policistidee, ma può essere considerato eccezionale per l'intero gruppo dei Protozoi limitatamente, s'intende, alla riproduzione gamica.

Un secondo fattore biologico anch'esso relativo al parassita e favorevole alla sua propagazione è rappresentato dalla resistenza vitale degli sporozoiti all'interno delle oocisti. Gruppi di oocisti provenienti da diverse gamontocisti sporificate contemporaneamente, furono sottoposte per i primi 5 giorni consecutivi e successivamente di 10 in 10 giorni all'azione del complesso enzimatico intestinale dell'ospite. Le oocisti furono mantenute a secco ed a temperatura ambiente. Dal secondo giorno dalla sporificazione fino ad oggi (160° giorno) tutte le prove sono risultate positive, vale a dire, con apertura delle oocisti e fuoriuscita di sporozoiti vitali. Ho anche sperimentato su oocisti di varie gamontocisti che conservavo in laboratorio da circa 2 anni, ma con esito negativo, e cioè, immediata apertura della parete oocistica, ma senza fuoriuscita di sporozoiti. Le oocisti di *S. gigas* permangono dunque infettanti per un periodo almeno superiore a 5 mesi.

Un terzo fattore favorevole riguarda invece l'etologia dell'ospite. I Tenebrionidi del genere *Blaps* i quali vivono in ambienti già di per sè confinati come cantine, ripostigli, androni oscuri, sono soliti, nell'interno di questi, ad aggregarsi in numero piuttosto elevato sotto la stessa pietra o tavola o nella stessa spaccatura. Da una fessura murale del Colosseo si estrassero in una sola volta 68 *Blaps gigas* e 74 *Blaps mucronata*. Evidentemente tali abitudini gregarie dell'ospite agevolano il propagarsi del parassita da un individuo all'altro dello stesso lotto.

(2) *Fattori limitanti la frequenza d'infezione.*

Data l'esistenza dei fattori sopra considerati, una volta che il parassita abbia raggiunto un certo lotto di *Blaps* sarebbe da attendersi la completa

estensione dell'infezione a tutti gli esemplari. Ciò in effetti si verifica ma solo in qualche caso. Negli altri casi quali fattori intervengono a limitare la diffusione del parassita?

Cerchiamo anzitutto di valutare quale percentuale delle gamontocisti emesse raggiunga in natura la sporificazione.

Ho reso noto in un lavoro precedente (FILIPPONI 1949a) come sterilizzando con bagno in alcool le gamontocisti prima di porle a sporificare in camera umida sterile si può ottenere la sporificazione praticamente della totalità delle gamontocisti. Al contrario, omettendo la sterilizzazione si raggiunge nel più favorevole dei casi l'1 o 2% di sporificazioni. La quasi totale distruzione delle gamontocisti è causata dalle muffe, come è chiaramente dimostrato anche dalla seguente esperienza. Una serie di gamontocisti dal bagno in alcool vengono direttamente passate in provetta su terreno culturale sterile all'agar carota. Dopo due giorni anneriscono e nel termine di una settimana tutte le gamontocisti hanno sporificato. Una seconda serie dopo lavaggio in soluzione fisiologica senza bagno in alcool vengono poste su identico terreno culturale. Nessun annerimento dopo due giorni. Dall'involucro di ciascuna gamontocisti si ergono delle ife miceliche che in pochi giorni distruggono completamente le gamontocisti invadendo l'intero terreno culturale. Con ogni verosimiglianza la stessa sorte all'incirca toccherà alle gamontocisti deposte dagli insetti negli androni oscuri ed umidi in cui abitualmente vivono. Anzi in tal caso la percentuale delle gamontocisti distrutte potrebbe essere aumentata da quelle meccanicamente schiacciate dagli insetti nei loro movimenti.

Una pressochè identica falcidia è riservata alle gamontocisti eventualmente deposte dalle *Blaps* nelle loro escursioni notturne in cerca di cibo. Qui oltre varie cause accidentali gioca essenzialmente il disseccamento diurno. *

---

* Circa l'influenza dell'umidità sullo sviluppo delle gamontocisti di Gregarine esistono dati discordanti nella bibliografia. A proposito di *Actinocephalus parvus* WESCHENFELDER (1938) osserva: « die Cysten müssen in der Natur in lufttrockner Umgebung ihre Entwicklung vollziehen; sie sind vor Austrocknung durch ihre starke Membran geschützt. Es ist deshalb unnötig, sie in Feuchtkammern zu bringen ». Al contrario ALLEGRE (1948), avendo messo a sporificare gamontocisti di *Gregarina rigida* in una serie di camere a diverso grado di umidità avrebbe constatato che, affinchè la sporificazione avvenga, è necessaria un'umidità relativa compresa tra il 50 e 90%; al di sopra e al di sotto di tali valori essa non avviene. Ho eseguito esperienze analoghe per *S. gigas* con i seguenti risultati. Se le gamontocisti sono state previamente sterilizzate, anche al 100% di umidità relativa si sviluppano totalmente. In camera perfettamente secca arrestano tutte il loro sviluppo, se poste ivi subito dopo l'emissione dall'insetto. Se invece antecedentemente vengono mantenute per un certo periodo in camera umida e quindi poste a secco, una piccola percentuale di gamontocisti continua la maturazione già dopo un solo giorno di permanenza in camera

Poichè la combinazione dei fattori favorevoli e sfavorevoli allo sviluppo delle gamontocisti può essere diverso da luogo a luogo è evidente che tali fattori potranno incidere in grado diverso sulla propagazione del parassita a seconda dei casi.

Altra causa che, sebbene in grado minore, può influire, limitandola, sulla diffusione del parassita è l'età dell'insetto al momento dell'invasione del parassita. Una immagine di *Blaps gigas*, mantenuta in condizioni ottimali, può vivere anche per 9 anni (LABITTE 1916); ma la durata media della vita, in condizioni naturali, è senza dubbio di molto inferiore. La durata

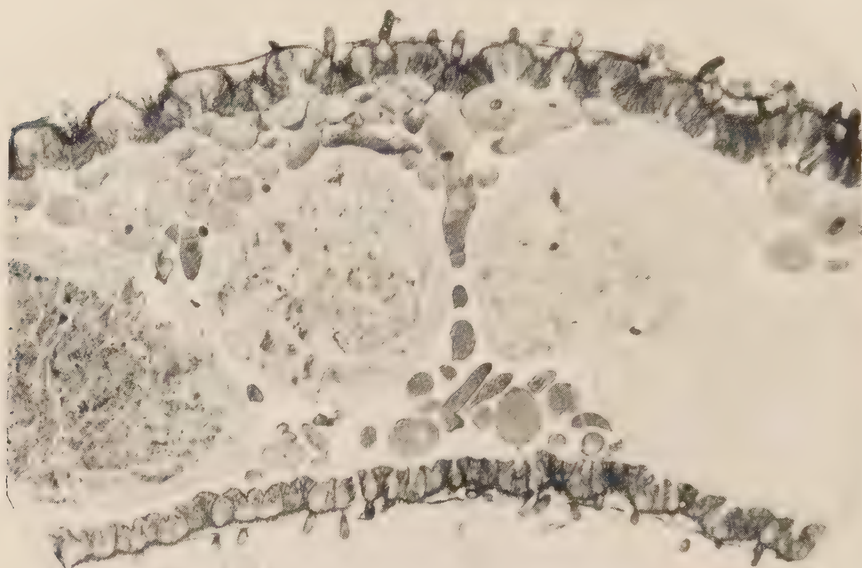


Fig. 2 — Sezione longitudinale di intestino medio di *Blaps mucronata* infetto dà *Stilocefalidi*. Sono presenti gamonti di varie età. Osservare la caratteristica distribuzione dei parassiti nelle zone fluidificate del bolo alimentare. (40 x).

---

umida. La percentuale aumenta col prolungarsi di tale periodo; dopo 4 giorni di camera umida praticamente tutte le gamontocisti proseguono nel loro sviluppo.

L'interpretazione mi pare ovvia. Le gamontocisti per svilupparsi hanno bisogno di un ambiente umido, finchè almeno la consistenza della parete non sia in grado di impedire il disseccamento. Le gamontocisti di *Actinocephalus parvus* munite fra l'altro di un alone gelatinoso, possono anche resistere alla siccità subito dopo la loro emissione dall'insetto; in altre specie invece (Stilocefalidi ad esempio) occorre un certo periodo prima che la parete si consolidi. I reperti di ALLEGRE su *Gregarina rigida* rappresentano probabilmente il risultato di due fattori diversi. l'umidità e lo sviluppo di muffe.

del periodo trofico di *S. gigas,* secondo quanto è stato precedentemente osservato, può anche superare i 7 mesi. Poichè una volta penetrato, mediante oocisti, nell'intestino del suo ospite, il parassita non potrà ulteriormente propagarsi se non al termine del suo periodo trofico, l'eventuale morte dell'ospite prima di questo periodo arresterà il propagarsi del parassita. Il seguente dato può fornire un'idea dell'entità delle perdite di Stilocefalidi per tale causa. Su 120 individui morti nei miei allevamenti oltre l'80% conteneva un numero vario di stadi trofici di Stilocefalidi delle diverse età. Il numero a volte esiguo di parassiti presenti faceva assolutamente escludere che la morte dell'insetto fosse causata dall'infezione stessa.

(3) *Fattori limitanti l'intensità d'infenzione.*

I fattori fin'ora esaminati, se possono limitare in diverso grado la frequenza di infezione, non hanno alcun effetto sulla sua intensità. Se ora una *Blaps* ingerendo le oocisti di una sola gamontocisti può introdurre ben 800.000 parassiti, come spiegare un numero medio di parassiti molto esiguo?

Anzitutto l'ingestione di tutte le oocisti di una gamontocisti da parte dell'insetto non dev'essere facile a verificarsi in natura. A sporificazione avvenuta i filamenti oocistici facilmente si spezzano e si disperdono. Basta aprire con poca cautela una capsula contenente gamontocisti già sporificate per vedere, nel caso che la capsula non sia più bagnata, volar via leggeri i ciuffi di oocisti. La dispersione dei filamenti oocistici è senza dubbio in natura il caso più frequente.

In secondo luogo molti parassiti vengono ulteriormente eliminati dopo aver raggiunto l'intestino dell'ospite.

Nel caso dell'infezione sperimentale sopra citato è chiaro che 15 milioni di Stilocefalidi a completo sviluppo non potrebbero neppure materialmente essere contenuti nell'intestino medio dell'ospite. Le esigenze trofiche del parassita e l'equilibrio biologico tra parassita e ospite debbono limitare ad un valore ancora di gran lunga inferiore il numero massimo consentito.

Ma come risulta dalle esperienze sopra riferite una certa eliminazione di parassiti avviene anche in casi di infezioni non eccessivamente intense. Il fatto trova conferma nelle due seguenti constatazioni. Nelle sezioni di intestini infetti è facile osservare dei giovani trofozoiti epicitozoici *, provvisti ancora del loro epimerite, completamente distaccati dall'epitelio intestinale dell'ospite. E' assai verisimile che tali trofozoiti non possano continuare in simili condizioni il loro sviluppo e vengano eliminati. Inoltre esaminando quotidianamente le feci di un lotto tenuto in gabbia di raccolta, di tanto in tanto si constata l'emissione di gruppetti di trofozoiti enterozoici ** morti.

---

* Aderenti all'epitelio intestinale dell'ospite mediante l'epimerite (FILIPPONI 1949 b).

** Liberi nel lume intestinale dopo il distacco dall'epitelio (FILIPPONI 1949 b).

Il fenomeno si verifica anche in caso di infezione poco intensa e non è in rapporto con l'inanizione dell'ospite. Avendo diviso un lotto di *Blaps* infette in due gruppi di cui uno a digiuno per un mese e l'altro a nutrizione normale, non si è notata differenza alcuna tra i due gruppi circa la emissione di trofozoiti morti. Il fatto è stato osservato anche in altre Gregarine, come ad esempio in *Gregarina blattarum* da Sprague (1941). Si tratta in entrambi i casi di una eliminazione provocata dalla reazione dell'ospite? e attraverso quale meccanismo? Non posseggo al momento elementi sufficienti per rispondere a tali quesiti.

4. — Combinazioni tra i vari fattori e caratteristiche fondamentali di un'infezione da Stilocefalidi.

Allo scopo di chiarire il complesso gioco di cause responsabili della vasta gamma di variabilità nel grado di infezione da Stilocefalidi riscontrata in lotti di *Blaps gigas* distribuiti su un'area di appena 100 km. di raggio, quale è quella da me esaminata, occorre analizzare distintamente due ordini di fatti: la diffusione del parassita da un ospite all'altro dello stesso lotto e la propagazione di esso da un lotto ad un altro.

Una volta che il parassita abbia raggiunto un certo lotto di *Blaps gigas*, data l'abitudine gregaria di questi, tenderà a diffondersi sempre più tra i vari individui. Teoricamente il limite massimo del grado di infezione è solo imposto dalle esigenze trofiche dei parassiti e dall'equilibrio biologico tra parassita e ospite.

Una condizione simile può ottenersi in laboratorio mediante infezione sperimentale o, come aveva già fatto Schneider (1875), conservando a lungo in un terrario un lotto di ospiti infetti.

In natura però ciò non si verifica. Il grado maggiore o minore nella frequenza e nella intensità di infezione è funzione di volta in volta di un complesso di fattori biologici, etologici, ambientali interessanti sia il parassita che l'ospite.

Alcuni di questi *fattori*, ai fini della propagazione del parassita, possiamo considerarli *costanti*, quali, ad esempio, la fecondità del parassita, il suo ciclo biologico, la resistenza vitale degli sporozoiti, l'etologia dell'ospite; altri fattori, quali l'umidità, la distruzione delle gamontocisti da parte di muffe, l'età dell'ospite all'istante dell'invasione del parassita, il numero di oocisti ingerite, l'eliminazione di stadi trofici dall'intestino dell'ospite, sono *variabili* e possono presentarsi nella loro forma *favorevole* o *sfavorevole*. Ne risulterà un numero rilevante di combinazioni possibili che giustifica ampiamente l'estrema variabilità dei dati riscontrati in natura.

L'analisi ora fatta non è peraltro sufficiente a spiegarci perchè mai, ad

esempio, nel lotto « Colosseo » il rapporto tra *S. reticulatus* e *S. gigas* sia di 100:3. Infatti, a parità di condizioni, la fecondità di *S. reticulatus* è inferiore a quella di *S. gigas*, per cui il rapporto dovrebbe essere a vantaggio di quest'ultimo. Nè si può invocare l'intervento di una concorrenza vitale tra le due specie parassite, favorevole a *S. reticulatus*, in quanto in altri lotti ad infezione mista il rapporto è circa eguale all'unità o raggiunge valori inferiori.

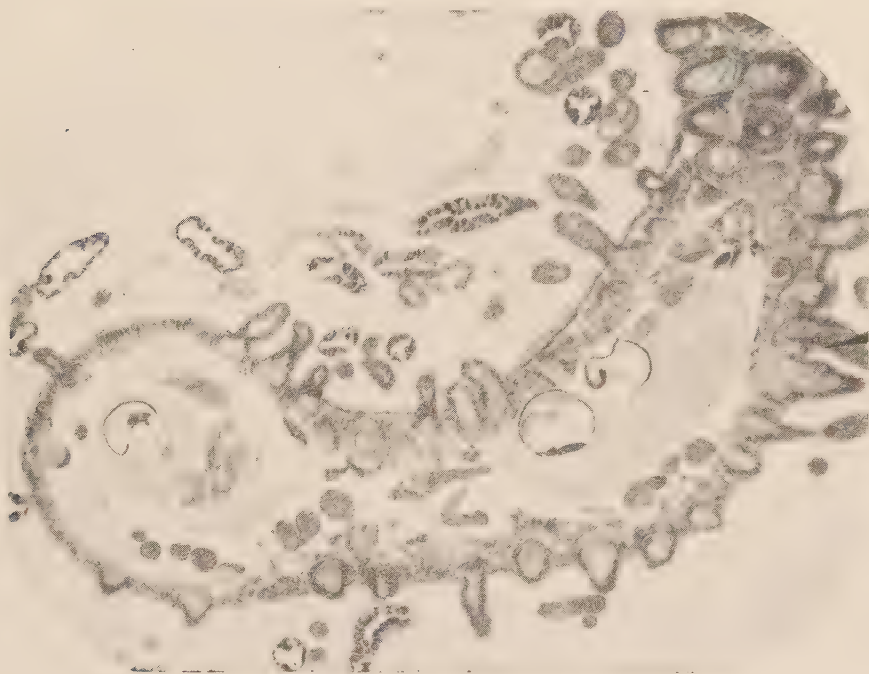


Fig. 3 — Sezione longitudinale di intestino medio di *Laemostemus algerinus* infetto da *Actinocephalus histolyticus*. FIL. Sono contemporaneamente presenti gamontocisti, gamonti, trofozoiti enterozoici e trofozoiti epicitozoïci. Tipica la discontinuità tra i vari stadi. (40 x).

Parimenti inspiegabile resterebbe la presenza di un lotto di *Blaps gigas* mostratosi per il periodo di due anni costantemente indenne da Stilocefalidi, sebbene situato a breve distanza da un altro infetto ed in pressochè identiche condizioni ambientali.

La ragione di ciò va ricercata in un secondo ordine di cause che interferendo con le precedenti regolano la propagazione del parassita da un lotto ad un altro.

I Tenebrionidi del genere *Blaps* sono insetti piuttosto sedentari. Probabilmente, non ostante la loro longevità, permangono nel luogo di origine, semprechè perdurino in questo propizie condizioni di vita. Ne risulta la

tendenza a costituire degli aggregati, isolati gli uni dagli altri, di cui gli androni sotterranei dei ruderi monumentali dell'antica Roma ci forniscono dei classici esempi.

In tali condizioni la propagazione del parassita da un lotto ad un altro resterà affidata a cause puramente accidentali. Potremmo prendere in considerazione tra queste il trasporto passivo delle oocisti da parte di altri Artropodi * e la migrazione forzata dell'ospite per le mutate condizioni della località di origine **

Sulla base di queste considerazioni mi pare sia facile rendersi conto della possibile esistenza di lotti di *Blaps gigas* affatto indenni da Stilocefalidi o in cui l'importazione di una delle due specie sia avvenuta soltanto di recente per cui non si è ancora sufficientemente propagata, come è lecito supporre, nel caso del lotto « Colosseo », per *S. gigas.*

Per quanto estremante fluttuante possa presentarsi in natura il grado di un'infezione da Stilocefalidi, esistono tuttavia dei limiti costantemente rispettati imposti dalla biologia stessa dei parassiti. Ed è appunto nell'ambito di questi limiti che è possibile individuare delle caratteristiche peculiari che ci permettano di discriminare un'infezione da Stilocefalidi da quella dovuta ad altri Sporozoi con differente ciclo biologico. Esse possono ridursi a tre:

1) I parassiti, almeno negli stadi giovanili, non sono mai isolati, vale a dire, l'*omopoliparassitismo* è di norma. Questa caratteristica, comune del resto a tutte le Gregarine e che suggerì ai primi ricercatori tale termine, deriva dal fatto che una sola oocisti assicura la presenza di 8 parassiti; inoltre l'ingestione di più oocisti è il caso più frequente in natura. L'affermazione a rigore vale solo per l'inizio dell'infezione, in quanto, come è stato precedentemente osservato, verso la fine del periodo trofico possono anche rinvenirsi esemplari isolati, tuttavia ciò avviene solo di rado.

2) Il numero di parassiti, anche in stadi avanzati dell'infezione può variare da poche unità a qualche migliaio. Questa seconda caratteristica è conseguente all'assenza di riproduzioni schizogoniche, per cui il numero

---

* Il fenomeno è reso possibile dall'alta specificità della sostanza che salda l'involucro oocistico lungo la linea di sutura nei confronti degli enzimi intestinali del proprio ospite, per cui le oocisti per caso ingerite da altri artropodi saranno, in genere, riemesse intatte con le feci di questi. Il trasporto può essere anche effettuato senza ingestione per semplice adesione dei filamenti di oocisti a qualche appendice esterna dell'artropodo stesso. Effèttivamente ho potuto osservare in natura l'una e l'altra modalità di trasporto, sebbene per altre Gregarine.

** Ad esempio gli androni del Colosseo costituivano una autentica « riserva » di Tenebrionidi. Tra *Blaps gigas* e *B. mucronata* mi hanno fornito in due anni quasi un migliaio di esemplari, sebbene mi fossi sempre preoccupato di non provocare un depauperamento eccessivo. Dopo le accurate pulizie effettuate in occasione dell'Anno Santo sono restati temporaneamente pressochè defaunati.

di parassiti presenti dipenderà unicamente dal numero di oocisti ingerite. Al contrario, nel caso di altri Sporozoi nel cui ciclo vitale compaiono riproduzioni schizogoniche, l'infezione tende in genere a divenire massiva, a meno che non intervengano reazioni efficaci da parte dell'ospite.

3) Se sono presenti parassiti di diverse età, come più comunemente avviene, gli intervalli tra queste, in condizioni naturali, sono tipicamente irregolari, essendo evidentemente altamente improbabile che in natura si verifichi una successione regolarmente continua di ingestioni di oocisti.

Così enunciate le caratteristiche di un'infezione da Stilocefalidi sono nettamente contrapponibili a quelle riscontrabili in un infezione da Schizogregarine o da Coccidomorfi e dovrebbero essere attribuibili ad ogni infezione da Policistidee. Ciò infatti generalmente avviene, come risulta dalle figure qui riprodotte. Ma se in qualche famiglia di Policistidee ciò non si verificasse, dovremmo necessariamente ricercarne la causa in un differente comportamentto biologico.

5. — Conclusioni.

1. - Una sola coppia gamontica di *Stylocephalus gigas* può produrre nella sporificazione circa 100.000 oocisti. Con ciò *S. gigas* ci offre l'esempio di massima fecondità fin'ora segnalata nelle Policistidee; e, rappresentando le oocisti il prodotto di un'unica riproduzione gamica, può inserirsi a buon diritto tra i casi eccezionali di prolificità dell'intera scala zoologica.

2. - La catena di oocisti raggiunge la lunghezza di m. 1,50. Essa costistituisce un lungo filamento avvolto a spirale e più volte intersecantesi. Il filo si salda nei punti di incrocio, per cui dipanando la spirale si ottengono delle anse più o meno ampie. Come caso limite, la saldatura avviene tra le oocisti corrispondenti di due spirali consecutive, dando origine a degli anelli.

3. - Il numero delle oocisti prodotte è correlato al volume della gamontocisti. Nella gamontocisti esaminata la formazione dei gameti è stata preceduta da 17 divisioni.

4. - La resistenza vitale degli sporozoiti nell'interno delle oocisti conservate a secco e a temperatura ambiente si protrae per un periodo superiore a 5 mesi, ma inferiore a due anni.

5. - La durata dello sviluppo trofico di *Stylocephalus gigas* può oltrepassare i 7 mesi.

6. - La percentuale di gamontocisti di Stilocefalidi che raggiunge nell'ambiente esterno la sporificazione è subordinata all'influenza di due fattori, l'umidità e lo sviluppo di muffe. In ambiente perfettamente secco lo sviluppo delle gamontocisti si arresta, a meno che la siccità non inter-

venga dopo un giorno almeno dalla deposizione. In ambiente umido le gamontocisti vengono falcidiate dalle muffe. Sterilizzando le gamontocisti, lo sviluppo prosegue indisturbato anche in ambiente saturo di vapor d'acqua.

7. - L'esame della distribuzione di *S. gigas* in lotti differenti di *Blaps gigas* distribuiti su un'area di circa 100 km. di raggio ha messo in evidenza una vasta gamma di variabilità sia rispetto alla frequenza che all'intensità d'infezione.

Tale distribuzione è la risultante di due ordini di cause responsabili le une della diffusione del parassita da un individuo all'altro dello stesso lotto, le altre della sua propagazione da un lotto ad un altro.

La distribuzione del parassita nell'ambito di un lotto di ospiti è determinato di volta in volta dalla combinazione di un gruppo di *fattori costanti* (fecondità del parassita, modalità del suo ciclo biologico, resistenza vitale degli sporozoiti, etologia dell'ospite) e la doppia alternativa *favorevole* o *sfavorevole* con cui può presentarsi un altro gruppo di *fattori variabili* (umidità ambiente, distruzione del parassita da parte di muffe, età dell'ospite all'istante dell'invasione del parassita, numero di oocisti ingerite, eliminazione di stadi trofici del parassita dall'intestino dell'ospite).

La propagazione da un lotto ad un altro è invece affidata a cause puramente accidentali, come possono essere il trasporto passivo di oocisti soprattutto da parte di altri Artropodi o l'emigrazione forzata delle *Blaps* per le mutate condizioni della località frequentata.

8. - Comunque pur nella estrema variabilità del grado di infezione è possibile individuare delle caratteristiche peculiari costantemente rispettate. Esse possono ridursi a tre: 1) i parassiti almeno negli stadi giovanili non sono mai isolati; 2) il numero dei parassiti presenti anche in stadi avanzati dell'infezione può variare da poche unità a qualche migliaio; 3) se sono presenti parassiti di diverse età, gli intervalli tra queste sono tipicamente irregolari.

RIASSUNTO

La fecondità degli Stilocefalidi è notevole. Una sola coppia gamontica di *S. gigas* può produrre 100.000 oocisti.

L'esame del grado di infezione di vari lotti di *Blaps gigas*, provenienti da località differenti ha dimostrato che (1) la frequenza di infezione varia moltissimo e può raggiungere in alcuni casi la totalità degli individui; (2) l'intensità di infezione è del pari variabilissima. Il numero medio più frequente di parassiti presenti nello stesso ospite è di alcune decine. Il numero massimo osservato in natura è di alcune centinaia. Mediante infezione sperimentale si possono raggiungere alcune migliaia, senza compromettere la vitalità dell'ospite.

Allo scopo di individuare le cause di tale distribuzione, l'A. analizza due serie di fattori, gli uni responsabili della diffusione del parassita da un individuo all'altro dello stesso lotto, gli altri della sua propagazione da un lotto all'altro.

Nella prima serie egli distingue dei *fattori costanti* (fecondità del parassita, modalità del suo ciclo biologico, resistenza vitale degli sporozoiti, etologia dell'ospite)

e dei *fattori variabili* (umidità ambientale, distruzione delle gamontocisti da parte di muffe, età dell'ospite all'istante dell'invasione del parassita, numero di oocisti ingerite, eliminazione di stadi trofici del parassita dall'intestino dell'ospite). Il grado di infezione di ogni lotto di ospiti rappresenta la risultante delle varie combinazioni possibili tra questi fattori.

La propagazione del parassita da un lotto ad un altro è invece affidata a cause puramente accidentali.

Sebbene estremamente variabile, un'infezione da Stilocefalidi presenta tuttavia delle caratteristiche costantemente rispettate, conseguenti alla biologia stessa del parassita, che permettono di distinguerla da qualsiasi infezione dovuta ad altri Sporozoi con diverso ciclo biologico.

RESUME

La fécondité des Stylocephalides est très remarquable. Une couple unique des gamonts de *S. gigas* peut émettre 100.000 oocystes.

L'examen du dégré d'infection de plusieures souches de *Blaps gigas* provenantes de différentes localités a montré (1) que la fréquence de l'infection est très variable pouvant le parasite, dans quelques cas, infester tous les hôtes d'un même endroit; (2) que l'intensité de l'infection résulte aussi extrêmement variable. Le nombre des parasites dans le même hôte atteint généralement quelques dizaines. Le plus grande nombre des parasites observés en nature est de quelques centaines. Par infection expérimentale on peut attendre quelques milliers sans endommager la vitalité de l'hôte.

Dans le but de déterminer les causes d'une telle distribution, l'A a analysé deux séries de facteurs, résponsables les uns de la diffusion du parasite d'un hôte à l'autre dans le même endroit, les autres de sa propagation d'une souche à l'autre.

Dans la première série il identifie des *facteurs constants* (fécondité du parasite, cycle évolutif, résistance vitale des sporozoites, éthologie de l'hôte) et des *facteurs variables* (humidité, destruction des gamontocystes par les moisissures, âge de l'hôte au moment de l'invasion du parasite, nombre des oöcystes ingérées, elimination des trophozoites de l'intestin de l'hôte). Le dégré d'infection en chaque souche représente la résultante des différentes combinations possibles entre ces different facteurs.

La propagation du parasite d'une souche à l'autre est déterminée au contraire par des causes entièrement accidentales.

L'infection par les Stylocephalides, bien que très variable, se présente toutefois avec des caractères constants, imposés par son cycle évolutif qui permettent de la différencier de l'infection déterminée par d'autres Sporozoaires avec un different cycle évolutif.

SUMMARY

The fecundity of *Stylocephalidae* is remarkable. One single gamontic couple of *S. gigas* can give origin to 100.000 oöcysts.

The examination of the degree of infection of various groups of *Blaps gigas* collected in different localities has shown that (1) the frequency of infection is very variable. In some cases all the individuals of a group are infected by parasites. (2) The intensity of infection is also extremely variable. Generally the parasites in the same host are of tens. The greatest number observed was of many hundreds. By experimental infection several thousands of parasites can be reached without injuring the life of the host.

In order to determine the causes of such a distribution, the A. has analised two series of factors the first responsible for the spreeding of the parasites from one individual to another of the same group; the other one responsible for its spreeding from one group to the other.

In the first series he distinguishes some *unvariable factors* (fecundity of the parasite, biological cycle, vital resistance of the sporozoites, ethology of the host) and some *variable* ones (environmental humidity, destruction of the gamontocysts by the molds, age of the host at the moment of the invasion of the parasite, number of the oocyst ingested, elimination of the trophozoites from the gut of the host). The degree of infection of every group of hosts is dependent on all the possible combinations of these different factors.

The spreeding of the parasites from one group to the other is instead due to merely occasional factors.

The infection by *Stylocephalidae*, though extremely variable, shows always some fixed characteristics, imposed by the life cycle of the parasite. By these characteristics is possible to distinguish an infection by *Stylocephalidae* from the infection caused by other *Sporozoa* having a different life cycle.

BIBLIOGRAFIA

ALLEGRE C. F. (1948). « Contributions to the life history of a gregarine parasitic in grasshoppers ». *Trans. Am. Microcs. Soc.*, *67*, 211-226.

FILIPPONI A. (1949 a). « Studi sugli *Stylocephalidae* (*Sporozoa*): I - Due nuovi Stilocefalidi parassiti di *Blaps gigas* ». *Riv. Parass.*, *10*, 205-229.

FILIPPONI A. (1949 b). « Gregarine policistidee parassite di *Laemostenus algerinus* con osservazioni sulla nomenclatura nelle Gregarine ». *Riv. Parass.*, *10*, 245-263.

FILIPPONI A. (1950). « Studi sugli *Stylocephalidae* (*Sporozoa*): II - Variabilità di gamontocisti e oocisti in tre popolazioni di Stilocefalidi in condizioni naturali ». *Riv. Parass.*, *11*, 103-142.

GRELL K. G. (1940). « Der Kernphasenwechsel von *Stylocephalus longicollis* » *Arch. Protistenkde*, *94*, 161-200.

LABITTE A. (1916). « Longévité de quelques insectes en captivité ». *Bull. du Muséum Nat. d'Histoire Naturelle*, *2*, 105.

LÉGER L. (1904). « La réproduction sexuée chez les *Stylorynchus* ». *Arch. Protistenkde*, *3*, 303-357.

SCHNEIDER A. (1875). « Contribution à l'étude des grégarines des invertébr's de Paris et de Roscoff ». *Arch. Zool. Expér.*, *4*, 496-604.

SPRAGUE V. (1941). « Studies on *Gregarina blattarum* with particular reference of chromosome cycle». *Illinois Biol. Monogr.*, *18*, 2, 1-57.

WESCHENFELDER R. (1938). « Die Entwicklung von *Actinocephalus parvus* ». *Arch. Protistenkde*, *91*, 1-60.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XI N. 3 - Settembre 1950

NOTE E OSSERVAZIONI

NOTE DI TECNICA PER LA PREPARAZIONE DEGLI ACARI

Accanto alle difficoltà, che derivano dalla sistematica piuttosto complessa degli acari che ostacolano chi si accinge allo studio di questo interessante gruppo di Artropodi, vi sono difficoltà di tecnica nella preparazione del materiale. Credo che per queste ragioni soprattutto siano così pochi oggi i ricercatori che si dedicano a tale studio e così scarse le pubblicazioni sull'argomento. Attualmente poco o nulla si sa, ad esempio, sull'acarofauna delle varie regioni d'Italia. Tale argomento, però, non solo ha grande interesse dal punto di vista faunistico, ma riveste altresì notevole importanza parassitologica, igienica ed economica data l'esistenza di specie patogene per l'uomo e gli animali, di quelle nocive per le piante, o capaci di deteriorare svariate merci, in particolare prodotti alimentari.

Pertanto credo possa riuscire utile una breve guida pratica che indichi allo studioso quale sia la tecnica da applicare nella preparazione dei vari gruppi di acari, anche perchè ben poco si trova in proposito sui vari manuali, compresi i migliori.

Tale tecnica deve, prima di tutto, essere *differenziata*, in quanto le norme, che valgono per una determinata Famiglia di acari, spesso sono controindicate per un'altra. Le difficoltà, per chi non abbia esperienza e perizia sufficienti, e gli inevitabili insuccessi, cui si va incontro, derivano precisamente dal misconoscere questa premessa, o dal non saperla praticamente applicare.

* * *

Lo studio degli acari e la loro determinazione sistematica richiedono l'esame di minuti dettagli morfologici, rilevabili soltanto al microscopio. E' quindi necessario allestire preparati microscopici e questi devono essere sufficientemente dimostrativi, tali cioè che valgano a mettere in evidenza quei particolari, che consentono una sicura diagnosi di specie, e durevolmente conservabili perchè permettano successivamente il confronto tra un esemplare già determinato e un altro da determinare.

Un preparato microscopico ben riuscito deve pertanto presentare l'acaro con le seguenti qualità:

a) sufficiente grado di estensione delle zampe e delle appendici boccali;

b) sufficiente trasparenza.

Disponendo di parecchi esemplari, è indicato, per diverse Famiglie, di procedere a dissezioni per rendere meglio visibili alcune parti dell'acaro, con le quali viene allestito un preparato apposito, che sarà di grande ausilio per la determinazione esatta della specie: palpi, tarso e tibia del primo paio di zampe, peli che ricoprono la parte posteriore dell'addome e cresta metopica, trattandosi della Fam. *Trombidiidae;* chele delle mandibole (specialmente dei ♂♂) trattandosi della Fam

Parasitidae, ecc. Tali dissezioni si fanno con due aghi e sotto il controllo di un microscopio « da dissezione ».

I migliori preparati si ottengono montando gli acari, previa disidratazione, in balsamo di Canadà. Però tale tecnica non è applicabile trattandosi di specie *piccole* e *fragili*.

Non è possibile delimitare nettamente le Famiglie di acari che possono essere sottoposti alla disidratazione senza pericolo per la loro integrità, senza che si abbia « raggrinzamento » del corpo e senza che le zampe, assieme con le appendici boccali, risultino stabilmente fissate in posizione di flessione. Più oltre esporrò la tecnica che io seguo per disidratare e montare in balsamo gli acari, ottenendone la perfetta estensione; ma il campo di applicazione di tale tecnica alle Famiglie di acari più o meno piccoli e fragili varia notevolmente in funzione dell'abilità e della pazienza più o meno grandi di ogni singolo preparatore. Le indicazioni che do non hanno quindi valore assoluto, ma di orientamento e di guida a chi, acquistando esperienza e perizia, potrà successivamente modificarle.

Possiamo, dal punto di vista della tecnica di preparazione, dividere gli acari in quelli che vanno montati in gomma al cloralio di Faure, previo trattamento col lattofenolo di Amann, ed in quelli che vanno montati in balsamo, previa disidratazione. Tra i primi comprendiamo gli acari di dimensioni inferiori ad 1 mm. circa, fragili e con tegumenti poco chitinizzati; tra i secondi quelli di dimensioni maggiori o con tegumenti più chitinizzati. Per brevità, dato il carattere pratico di queste note, non esporrò la tecnica di altri metodi che sono stati proposti e da taluno seguiti, ma che non mi hanno sempre dato risultati sodisfacenti.

Superfamiglie e Famiglie di acari da montare preferibilmente in gomma al cloralio	Superfamiglie e Famiglie di acari da montare preferibilmente in balsamo di Canadà (1)
Opilioacaridae With	Oribatoidea Banks
Eriophyidae Nal.	*Holothyridae* Thorrel
Acaroidea Latr.	Ixodoidea Banks
Tarsonemoidea Banks	Parasitoidea Banks (2)
Tetranychidae Donn.	*Demodicidae* Nic. (3)
Pterigosomidae Oud.	Hydrachnoidea Banks
Cheyletidae Leach	*Caeculidae* Berl.
Eupodoidea Banks	*Trombidiidae* Leach
	Erythraeidae Oud.
	Anystidae Oud.
	Smarididae Kr.

(1) Tutte le forme larvali degli acari appartenenti alle Superfamiglie e alle Famiglie elencate in questa colonna vanno montate, invece, in gomma al cloralio.

(2) La Superfamiglia Parasitoidea comprende anche Famiglie di acari che vanno preparate preferibilmente in gomma al cloralio. Non risulta, però, possibile procedere a ulteriori suddivisioni senza allungare eccessivamente il presente schema.

(3)Si presuppone la colorazione con fucsina di Ziehl secondo la tecnica indicata più oltre

(Il presente schema si basa sulla classificazione degli acari secondo Lombardini [1938 e 1942]).

I. — Montaggio in gomma al cloralio.

1. — *Strumentario e recipienti.*

Lo strumentario, indispensabile per trasportare gli acari da un liquido all'altro, o per deporli sul portaoggetti, si riduce ad un comune ago da dissezione, dritto o curvo, montato su manico. Quanto ai recipienti, il tipo più adatto mi sembra sia la «salierina» detta anche «portaoggetti a vaschetta per embriologia» in cristallo bianco di cm. 4×4 con incavo di 8 mm. di profondità per 32 mm. di diametro il cui contenuto può essere facilmente esaminato al microscopio da dissezione e dove gli acari, anche piccoli e poco numerosi, sono rapidamente ritrovati ogni volta che occorre osservarli.

2. — *Lattofenolo di* Amann.

Gli acari, vivi o morti, si pongono nel lattofenolo di Amann e vi si lasciano per 1-3 giorni fino a completa chiarificazione. Una permanenza più lunga non nuoce, poichè gli acari si conservano benissimo nel lattofenolo per molto tempo. Il lattofenolo di Amann ha la seguente composizione:

Acido fenico cristallizzato chimicamente puro . . .	gr. 10
Acido lattico	gr. 10
Glicerina bidistillata	gr. 20
Acqua distillata	cc. 10

Volendo procedere a dissezioni è opportuno eseguirle quando l'acaro è immerso nel lattofenolo, servendosi di due aghi e operando sotto il controllo del microscopio.

3. — *Gomma al cloralio.*

Dalla «salierina» col lattofenolo gli acari vengono prelevati con un ago e trasportati in una goccia di gomma al cloralio deposta al centro del porta oggetti. Si controlla al microscopio binoculare da dissezione la posizione assunta dall'acaro e, manovrando con un ago, gli si da l'orientamento voluto, si allontanano eventuali impurità, ecc. Indi si procede al montaggio ponendo il coprioggetti, badando che l'acaro si trovi al centro del preparato e che non vi siano bolle d'aria; altrimenti alzare cautamente il coprioggetti e ripetere l'operazione. Occorre saper adoperare la quantità giusta di gomma al cloralio: se tale quantità è insufficiente l'acaro può essere schiacciato dal coprioggetti, altrimenti la gomma, deposta in eccesso, imbratta il porta ed il coprioggetti. Una lieve pressione, esercitata coll'ago tenuto obliquo, sul coprioggetti in corrispondenza del punto dove trovasi l'acaro, permette spesso di ottenere una maggiore estensione delle zampe e delle appendici. Tale manovra va fatta con la massima cautela sotto il controllo del microscopio.

Per provocare una rapida solidificazione della gomma al cloralio il preparato deve essere posto per qualche giorno in termostato a 37°-40°. Successivamente si asporta con una lametta da rasoio di sicurezza la gomma che trovasi eventualmente intorno al coprioggetti ed il preparato è pronto per essere lutato. Conviene eseguire subito tale operazione, appena il preparato è stato estratto dal termostato e pulito, altrimenti, specie in ambiente umido, la gomma al cloralio ha la tendenza a ridiventare semi-fluida.

Vi sono diverse formule di gomma al cloralio; la migliore è quella di Faure:

Idrato di cloralio	gr. 50
Glicerina bidistillata	cc. 20
Gomma arabica	gr. 30
Acqua distillata	gr. 50

Sciogliere a freddo il cloralio, aggiungere la glicerina, mescolare bene e mettere la gomma arabica. Questa richiede qualche giorno per sciogliersi completamente, deve essere della migliore qualità, in « chicchi » chiari. Decantare e filtrare per lana di vetro e conservare in boccetta detta « per balsamo » con cappa a smeriglio e bacchetta di vetro.

4. — *Trattamento di materiale disseccato.*

Capita talvolta di dover preparare acari morti da tempo e disseccati, quindi assai fragili, con raggrinzamento del corpo, con zampe ed appendici in flessione. Il trattamento col lattofenolo è per lo più insufficiente a « rigonfiare » l'acaro e a ridargli l'aspetto naturale. Per ricuperare tale materiale si ricorre all'uso del seguente liquido:

Idrato di cloralio	gr. 40
Acido acetico	cc. 30
Acqua distillata	cc. 30

Gli acari vi permangono per qualche ora fino a che non sia raggiunto il risultato voluto; dopo si monta in gomma al cloralio di FAURE secondo la tecnica precedentemente esposta

5. — *Mastici per lutare.*

Pur non essendo indispensabile, è preferibile lutare i preparati: si ha maggiore solidità e migliore conservazione. A mio avviso il miglior mastice è quello di LATASTE (modificato), che si prepara facendo fondere insieme, su piccola fiamma, gomma e paraffina a parti uguali. Si useranno i comuni tubi di gomma rossa, che trovansi in ogni laboratorio, tagliati in anelli di 0,5-1 cm. di altezza. La fusione avviene lentamente e deve essere condotta con precauzione, dato che la miscela è infiammabile. Adoperare un grande crogiuolo di porcellana collocato sotto una cappa munita di tiraggio efficiente per evitare di spargere l'odore di « gomma bruciata ». Si conserva in un recipiente metallico a riparo dalla polvere.

Il mastice si applica a caldo, facendolo fondere al momento dell'uso su piccola fiamma, con un pennello. Per fare sparire le irregolarità lasciate dal pennello ed ottenere una superficie liscia, flambare rapidamente col becco BUNSEN direttamente la superficie stessa del mastice. Lasciar raffreddare per poi ritoccare con un bisturi, od una lametta, i contorni della cornice formata dal mastice sul preparato.

Adoperando coprioggetti rotondi si dovrà lutare usando la *tournette*.

Altro mastice per lutare si prepara sciogliendo ceralacca (si prenda quella della migliore qualità) in alcool assoluto fino a consistenza sciropposa. Si ottiene così un mastice assai buono da usare, però, solo su preparati con gomma al cloralio già completamente solidificata. Si eviti la ceralacca rossa, poichè spesso dà luogo, a lungo andare, alla diffusione del colore nel preparato; tale inconveniente non si verifica mai, a mia esperienza, usando la ceralacca verde.

Possono essere ugualmente usate le vernici del commercio alla nitrocellulosa: anche in questo caso è da evitare, per la suddetta ragione, il colore rosso. Tali vernici si applicano solo su preparati con gomma al cloralio completamente solidificata.

Non usare mai il mastice di DU NOYER per i preparati allestiti con gomma al cloralio, perchè in tal caso questa, dopo un certo tempo, si intorbida fortemente.

II. — MONTAGGIO IN BALSAMO DI CANADÀ.

1. — *Strumentario e recipienti.*

Trattandosi di maneggiare acari di dimensioni maggiori, gli aghi da dissezione non sono più adatti per poter facilmente trasportare il materiale da un liquido al-

l'altro durante le manipolazioni di preparazione e disidratazione. Succede assai spesso che ostinandosi a voler afferrare con un ago l'acaro o spingendolo con tale strumento lungo la parete del recipiente, si ha la sorpresa di trovarlo poi privo di una zampa o di appendici. Tale inconveniente si verifica per lo più nell'ultima fase della preparazione, quando l'acaro trovasi in alcool assoluto od in xilolo.

Il pericolo di danneggiare così il materiale si evita adoperando per maneggiare gli acari durante la disidratazione piccole spatole, che è facile preparare da sè. Basta ritagliare tali spatoline da una sottile lamina di latta, dando ad esse la larghezza voluta (2-3 mm.) ed innestarle su un portaghi.

Quanto ai recipienti, molto comode risultano le scatole di vetro, dette « per colorazioni », cilindriche di 4 cm. di diametro con coperchio a scanalatura circolare smerigliata.

2. — *Fissazione in estensione.*

La prima difficoltà da superare consiste, come già si era detto, nel fissare l'acaro in estensione. Tale fissazione in estensione non solo è desiderabile per avere un « bel preparato » dal punto di vista estetico, ma è altresì necessaria per poter osservare vari dettagli morfologici del corpo e delle appendici sui quali si baserà la determinazione dell'esemplare.

Qualche A. raccomanda vivamente l'uso dell'alcool a 70° bollente per uccidere e fissare in estensione gli acari. Devo dire che questo metodo ben raramente mi ha dato risultati sodisfacenti. Trattando numerosi acari con tale procedimento se ne trova qualcuno fissato in buona posizione, mentre la grande maggioranza si presenta con zampe ed appendici stabilmente ripiegate sul corpo, senza che nulla valga oramai a modificare tale risultato.

Da anni mi servo invece, con ottimi risultati, di alcool al 1/3 dove gli acari, appena raccolti, vengono immersi. Gli acari vi muoiono abbastanza rapidamente e vi si lasciano per qualche ora, o per 24 ore in rapporto alla loro grandezza; le zecche vi possono stare anche 48 ore e più. L'alcool al 1/3, già preconizzato da Ranvier, è noto da molto tempo nella tecnica microscopica come liquido macerante di cui i vecchi istologi largamente si servivano per fare i preparati « per dissociazione ». Nel caso degli acari tale liquido, pur mantenendo perfettamente integra nei più minuti dettagli la morfologia esterna, produce un certo grado di macerazione dei muscoli degli arti per cui questi, lungi dall'essere irriducibilmente contratti, sono flessibili ed avendo perduto ogni elasticità rimangono nella posizione che si fa ad essi assumere.

Recentemente, nel 1944, Boardman, avendo riscontrato i suddetti inconvenienti, derivanti dall'uso dell'alcool a 70°, ha proposto la seguente miscela:

Alcool a 20°	parti 97
Etere	parti 3

Ho avuto ottimi risultati anche dall'uso di questo liquido. La sua azione, però, non è, come ritiene l'A. e come potrebbe sembrare a prima vista, quella di provocare anestesia e quindi rilasciamento muscolare: l'aggiunta di etere è del tutto superflua in pratica e l'azione del liquido si riduce, anche in questo caso, alla azione macerante di una soluzione alcoolica diluita del tutto equivalente a quella del vecchio alcool al 1/3 di Ranvier.

Gli acari, trattati per qualche ora con alcool al 1/3 fino ad ottenere la completa flessibilità degli arti, vengono posti su un portaoggetti, bene sgrassato e pulito, in una goccia del liquido macerante. La quantità di liquido deve essere appena sufficiente per bagnare l'acaro ed assicurarne l'adesione al vetrino per capillarità. Sotto il controllo di un microscopio da dissezione e con l'ausilio di due aghi, l'acaro viene posto nella posizione desiderata con arti ed appendici in estensione. Indi vi si fa cautamente cadere sopra una goccia di alcool a 70° che fissa l'acaro in tale posizione. E' consigliabile, dopo qualche minuto, di sovrapporre un coprioggetti (o, se

occorre un peso maggiore, un frammento di portaoggetti) che contribuirà ad appiattire alquanto l'acaro.

3. — *Disidratazione.*

Dopo 20-30 minuti dall'inizio della fissazione, durante i quali l'acaro viene spesso osservato al microscopio da dissezione correggendo se occorre la posizione degli arti ed aggiungendo nuovo alcool per evitare il prosciugamento, è possibile iniziare la disidratazione. A tale scopo si aspira l'alcool a 70° con carta bibula accostandola al margine del coprioggetti e si fa penetrare sotto di esso, con una sottile pipetta, l'alcool a 95°. Occorre badare a non muovere durante tali operazioni il coprioggetti per non modificare la posizione fatta assumere all'acaro.

La disidratazione continuerà così fino all'alcool assoluto e allo xilolo, operando preferibilmente sempre sotto al coprioggetti, aspirando il liquido con carta bibula, aggiungendo quello successivo con una pipetta e facendolo penetrare per capillarità. Giunti fino allo xilolo, si toglie il coprioggetti, si porta il vetrino con l'acaro nel recipiente contenente xilolo e vi si lascia cadere l'acaro stesso.

Invece dell'alcool etilico assoluto, che si idrata troppo facilmente all'aria, consiglio l'alcool amilico, che risponde ottimamente allo scopo e che io adopero costantemente

4. — *Montaggio in balsamo.*

L'acaro, completamente disidratato (controllare, osservando su fondo nero, che non vi siano nubecole bianche in xilolo - altrimenti rimettere l'acaro per qualche minuto in alcool amilico) e chiarificato, è pronto per essere montato in balsamo di Canadà. Si adoperi il balsamo della migliore qualità, badando che sia perfettamente limpido e non troppo denso.

L'acaro deve risultare situato in corrispondenza del centro del coprioggetti; se occorre è possibile spostare l'acaro stesso muovendo con un ago il coprioggetti ed introducendo cautamente sotto di esso un crine, od un mandrino molto sottile di un ago da iniezioni ipodermiche. E' spesso utile porre sul coprioggetti un peso di 5-10 gr. Piccole bolle d'aria, eventualmente presenti nel balsamo, scompaiono spontaneamente assai presto. Non mettere mai in termostato i preparati di acari montati in balsamo coll'idea di affrettarne la solidificazione, ma attendere che questa avvenga a temperatura ambiente.

Succede assai spesso, in particolare con acari a tegumenti fortemente chitinizzati (*Ixodoidea*, *Parasitoidea*, ecc.), che un preparato, che sembrava bene riuscito, si guasta in pochi minuti, od in poche ore: osservato su fondo nero l'acaro appare bianco ed opaco, mentre visto al microscopio è nero ed ha perso del tutto la trasparenza che aveva al momento del montaggio. Tale fenomeno si determina in seguito alla evaporazione dello xilolo nell'interno dell'acaro, mentre il balsamo non vi è ancora penetrato: il vuoto che ha così tendenza a formarsi viene riempito da sostanze gassose, la cui presenza conferisce al preparato le proprietà ottiche suddette. L'inconveniente in parola si previene in parte usando soluzioni piuttosto diluite di balsamo, onde facilitarne la penetrazione ed evitando di scaldare il preparato per non affrettare l'evaporazione dello xilolo nell'interno dell'acaro, ma tali misure non sempre sono sufficienti.

Le sostanze gassose, che hanno riempito le cavità interne dell'acaro, non hanno alcuna tendenza ad essere riassorbite e a scomparire; pertanto l'alterazione subita dal preparato è stabile e definitiva, ove non si intervenga con opportuni accorgimenti tecnici. Stando alla mia sperienza, non vi è che un metodo per ridare al materiale la perduta trasparenza: si rimetta l'acaro in xilolo e lo si lasci in questo liquido fino a che non riacquisti l'aspetto normale (talora occorre qualche giorno). Raggiunto tale risultato si prepari una soluzione molto diluita di balsamo in xilolo (una parte di balsamo per cinque-sei parti di xilolo), vi si ponga l'acaro e si attenda che la soluzione si concentri lentamente a temperatura ambiente per evaporazione pro-

gressiva dello xilolo, fino a che non acquisti, dopo qualche giorno, una consistenza sciropposa. Durante tale periodo il recipiente che contiene la soluzione deve essere mantenuto aperto e conservato a riparo dalla polvere. Quando la soluzione di balsamo ha assunto una consistenza da permettere il montaggio, lo si esegua.

5. — *Montaggio di numerosi acari.*

Spesso si ha interesse a montare su un solo vetrino numerosi acari. In tal caso conviene evitare che questi si trovino distribuiti alla rinfusa, spesso sovrapponendosi in modo disordinato. Prima di tutto si disporranno gli acari in maniera che una parte presenti all'osservatore il lato ventrale e l'altra quello dorsale. Gli acari verranno poi ordinati regolarmente in più file in uno strato di balsamo sufficientemente spesso e si lascerà solidificare quasi completamente il balsamo stesso tenendo il vetrino a riparo dalla polvere per il tempo necessario. Quindi si sovrappone il coprioggetti (occorrendo si prenderanno quelli grandi 24 × 32 mm.) recante una grossa goccia di balsamo. E' preferibile che gli acari siano stati in precedenza trattati nel modo indicato alla fine del paragrafo precedente.

6. — « *Cellule* » o « *camere* ».

Montando un acaro di dimensioni piuttosto grandi, il suo spessore impedisce al coprioggetti di disporsi parallelamente al portaoggetti e al balsamo di distribuirsi in uno strato di uguale spessore; il coprioggetti forma invece col portaoggetti un angolo diedro più o meno aperto.

Tale inconveniente potrebbe essere evitato usando, invece dei portaoggetti comuni, i vetrini con « cellula di Koch ». Detti vetrini sono però troppo costosi ed il loro formato differisce in genere da quello dei portaoggetti usuali. E' pertanto preferibile ricorrere ad un espediente tecnico consistente nell'introdurre (manovrando con aghi da dissezione) tra copri- e portaoggetti, dal lato dove essi si toccano, un pezzetto di crine, un frammento di vetrino, una striscia di cartoncino imbevuta di xilolo, o qualunque altro materiale, che sollevi il coprioggetti dal lato dove esso tende ad abbassarsi.

Buono è il metodo di Legendre consistente nel fondere i quattro angoli del coprioggetti sulla *veilleuse* di un becco Bunsen: il vetrino, divenuto così più spesso in corrispondenza degli angoli formerà col portaoggetti una « camera » più o meno profonda.

Secondo la mia esperienza, però, il modo migliore di allestire una « cellula » consiste nel fissare sul portaoggetti con un pò di balsamo due strisce, larghe 2-3 mm., di celluloide, regolando la lunghezza di esse e la distanza interposta sulle dimensioni del coprioggetti che si intende adoperare. Rispondono ottimamente allo scopo i cosiddetti « coprioggetti infrangibili » o « in vetro sintetico » del commercio, aventi uno spessore che va da 0,30 a 0,60 mm.

Quando la « cellula » è pronta l'acaro viene posto al centro e montato in balsamo nel modo usuale.

7. — *Vernici per lutare.*

I vecchi preparati presentano assai spesso un intorbidamento del balsamo in corrispondenza dei margini del coprioggetti, dove il balsamo stesso è a contatto dell'aria. Tale intorbidamento, con l'andar del tempo, tende ad allargarsi ed a raggiungere il centro del vetrino. Per evitare l'inconveniente suddetto è consigliabile di lutare il preparato. Questa operazione deve essere fatta, però, soltanto quando il balsamo si è completamente solidificato o, perfino, quando l'intorbidamento in parola accenna già a comparire; altrimenti la vernice penetra sotto al coprioggetti mescolandosi col balsamo e guastando il preparato.

Le migliori vernici sono quelle alla nitrocellulosa (numerose nel commercio) che, occorrendo, possono essere diluite con acetato di amile. E' preferibile usare

sempre lo stesso colore della vernice per un determinato gruppo di preparati ed un altro colore per un altro gruppo. Tutti i colori possono essere adoperati, compreso il rosso, non sussistendo più, nel caso di preparati montati in balsamo, l'inconveniente segnalato per quelli montati in gomma al cloralio di FAURE.

Si può ricorrere anche alla ceralacca (di qualunque colore) sciolta in alcool assoluto.

Per i coprioggetti rotondi si dovrà fare uso della *tournette*.

E' evidente che, prima di lutare, si asporterà accuratamente con una lametta da rasoio il balsamo che abbia eventualmente imbrattato il preparato.

III. — METODI SPECIALI.

1. — *Preparazione di Demodicidae.*

Gli acari di questa Famiglia, piccoli e molto trasparenti, sono acido-resistenti. Questa proprietà può essere utilmente sfruttata durante la preparazione consistente nella colorazione colla fucsina fenicata di ZIEHL, decolorazione con alcool-acido lattico e montaggio in balsamo. I passaggi da un liquido a quello successivo si faranno per centrifugazione. Il balsamo verrà fatto cadere a gocce nella provetta da centrifuga, dopo aver gettato via lo xilolo; il materiale verrà poi prelevato con una pipetta e montato.

Consiglio di attenersi alla tecnica seguente:

a) Il materiale contenente i *Demodex*, fissato in alcool e sgrassato con etere o cloroformio, viene colorato colla fucsina fenicata di ZIEHL per 30 minuti a 50°C o per un'ora alla temperatura ambiente.

b) Lavaggio in acqua.

c) Decolorazione per 5 minuti nella seguente miscela:

Acido lattico	cc. 5
Alcool a 95°	cc. 95

d) Lavaggio in acqua.

e) Disidratazione in alcool a 70°, 95°, alcool amilico.

f) Xilolo. Montaggio in balsamo.

Solo gli acari risultano colorati in rosso brillante, mentre altro materiale proveniente dalla pelle è incolore, o debolmente colorato in rosa.

Questa tecnica può essere seguita, con buoni risultati, anche nella preparazione di acari agenti di « rogne » dei vari animali.

2. — *Preparazione di zecche.*

Le larve saranno montate in liquilo di FAURE, previa chiarificazione in lattofenolo (ved. sopra), mentre ninfe e adulti devono essere montati in balsamo, previo eventuale trattamento con potassa caustica.

L'uso della potassa deve essere riservato ad esemplari opachi e spessi, onde aumentarne notevolmente la trasparenza, per renderli molli ed appiattirli. Si proceda nel seguente modo:

a) Trattamento con una soluzione di potassa (o soda) caustica al 10% per qualche giorno a temperatura ambiente, o per qualche ora in termostato, fino al risultato voluto.

b) Lavare in acqua distillata acidulata con acido acetico, poi in acqua distillata.

c) Disidratare in alcool a 70°, 95°, alcool amilico.

d) Xilolo, Montaggio in balsamo.

Durante la disidratazione le zecche vengono poste tra due portaoggetti tenuti insieme con uno o due elastici, ottenendosi così il voluto appiattimento degli esemplari.

Occorre saper opportunamente limitare l'applicazione di tale tecnica. La potassa distrugge dapprima tutte le parti molli dell'acaro risparmiandone l'esoscheletro di cui modifica il colore e la consistenza; successivamente anche la morfologia dell'esoscheletro viene alterata ed alcuni dettagli di esso, spesso importanti per la sistematica, possono definitivamente sparire. Ne deriva che bisogna badare a non prolungare l'azione della potassa oltre il tempo strettamente necessario. Anche l'appiattimento esagerato, che talora si ottiene, modifica eccessivamente i reali rapporti tra vari organi. Tali sono, ad esempio, i principali inconvenienti del procedimento proposto da BATTE (1948) e consistente nel prolungare il trattamento con la potassa al punto da ottenere una decolorazione quasi completa delle zecche e da dover poi... ricolorarle con acido pirogallico.

Pertanto, di fronte a grossi esemplari, converrà spesso rinunciare all'allestimento di preparati microscopici e, specialmente se le zecche non sono ripiene di sangue, si ricorrerà alle spille entomologiche e alle apposite scatole per conservare le zecche come una collezione di insetti. Se invece gli esemplari sono ripieni di sangue converrà tenerli in tubetti ben chiusi con alcool a 70° e glicerina al 5%.

L'uso della potassa può talora riuscire assai utile anche nella preparazione di acari con tegumenti foschi e poco trasparenti come alcuni *Oribatoidea, Parasitoidea,* ecc. Le riserve, formulate a proposito della preparazione delle zecche, valgono, naturalmente, anche in questi casi.

3. — *Sezione di acari.*

I procedimenti finora esposti consentono l'osservazione della morfologia esterna degli acari e la loro determinazione sistematica; volendo studiare, invece, la morfologia interna e la citologia sarà necessario procedere alla inclusione in paraffina, od in paraffina e celloidina, ed alla sezione al microtomo.

A tale scopo gli acari saranno fissati per 24 ore preferibilmente nella miscela di DUBOSCQ-BRASIL, che è consigliabile preparare al momento dell'uso e che ha la seguente composizione:

Alcool a 80°	cc. 150
Formolo a 40	cc. 60
Acido acetico	cc. 15
Acido picrico	gr. 1

Si può usare anche la miscela di GILSON, o quella di CARNOY, mentre sono da scartare tutti i fissatori costituiti da soluzioni acquose.

Successivamente si procederà alla disidratazione, all'inclusione in paraffina e alla sezione al microtomo seguendo le consuete norme di tecnica microscopica. Sono da preferire sezioni seriali.

Per la disidratazione, che precede l'inclusione in paraffina, consiglio di usare l'alcool amilico invece dell'alcool etilico assoluto.

Le sezioni potranno essere colorate con Ematossilina-Eritrosina (da preferire all'Eosina), Ematossilina ferrica, Safranina-Verde Luce (metodo personale), ecc.

Disponendo di numerosi esemplari della specie di cui si desidera studiare la morfologia interna, è spesso consigliabile includerli tutti in un unico blocchetto di paraffina. I successivi passaggi da un recipiente all'altro, durante la disidratazione e l'inclusione, si faranno allora mettendo tutti gli acari in un tubetto di vetro lungo 3-4 cm., largo 1,5-2 cm. circa e aperto alle due estremità di cui l'inferiore è stata chiusa con un pezzo di organdis legato con un filo. Trasportando questo tubetto, sempre mantenuto verticale e con l'estremità che reca l'organdis sempre rivolta in basso, da un recipiente all'altro, tutte le operazioni necessarie per l'inclusione si compiono facilmente e con rapidità. L'inclusione definitiva viene eseguita nello stesso

tubetto ponendolo tra le sbarre di LEUCKART (o un dispositivo analogo) contenenti paraffina liquida che si lascerà solidificare. Indi si asporta la paraffina che circonda il tubetto, si toglie il filo e l'organdis e, scaldando molto leggermente il tubetto stesso (o rompendolo), si fa uscire il cilindretto di paraffina dove si trovano inclusi tutti gli acari.

4. — *Preparazione di tessuti parassitati da acari.*

Si tratta, per lo più, di pelle di animali affetti da « rogna ». La fissazione verrà fatta nella miscela di DUBOSCQ-BRASIL, mentre sono da evitare tutti i fissatori costituiti da soluzioni acquose. Si eseguirà poi l'inclusione in paraffina e la sezione al microtomo; sono da preferire sezioni piuttosto spesse di 12-15 μ che dimostrano meglio i parassiti. Tutte le colorazioni riescono bene; consiglio in particolare, oltre all'Ematossilina-Eritrosina, l'Ematossilina ferrica-Van Gieson ed il mio metodo alla Safranina-Verde Luce che da una colorazione policroma con reazioni metacromatiche. Per la tecnica di tale metodo ved.: « Précis de Microscopie» di LANGERON ed. 1949, pag 606.

Dr. OLEG STARKOFF

BIBLIOGRAFIA.

BATTE E. G. (1948). A technique for mounting ectoparasites. *J. of Econom. Entomol.*, *41*, 523.

BOARDMAN E. T. (1944). Methods for collecting ticks for study and delineation. *J. Parasitol.*, *30*, 57.

CARAZZI D., LEVI G. (1915). Tecnica Microscopica. Ed. Soc. Ed. Libraria, Milano.

KRAUS D. (1901). Ueber färbetechnische Methoden zum Nachweis des Acarus folliculorum. *Arch. f. Dermat. u. Syph.*, *58*, 351.

LANGERON M. (1949). Précis de Microscopie. Ed. Masson, Paris.

LOMBARDINI G. (1938). Chiave analitica ai sottordini, alle superfamiglie ed alle famiglie degli acari. *Redia*, *24*, 199.

LOMBARDINI G. (1942). Contributo alla conoscenza della morfologia dei Demodicidae. Chiave analitica del genere « Demodex » Owen. *Redia*, *28*, 89.

NEVEU-LEMAIRE M. (1938). Traité d'Entomologie Médicale et Vétérinaire. Ed. Vigot. Paris.

STARKOFF O., STARKOFF I. (1950). Contributo alla conoscenza dell'acarofauna di Roma e dintorni. *Riv. di Parassitol.*, *11*, 85.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XI N. 3 - Settembre 1950

RECENSIONI

MARA L.: Studio morfologico dell'uovo di *Anopheles dancalicus* CORRADETTI, 1939. *Bollettino della Società Italiana di Medicina e Igiene Tropicale (sezione Eritrea)*, Asmara, vol. VIII, n. 1-2, pp. 76-83, 1948.

In questa rivista sono comparse la descrizione originale dell'*Anopheles dancalicus* (CORRADETTI A. Una nuova specie di Anopheles rinvenuta in Dancalia: *Anopheles (Neocellia) dancalicus* n. sp. *Riv. Parass.*, 3, 277-278, 1939). e, successivamente, l'ampia descrizione dettagliata dei vari stadi di questa specie anofelica (CORRADETTI A. Descrizione dell'*Anopheles (Neocellia) dancalicus. Riv. Parass.*, 4, 31-44, 1940). L'unico stadio non descritto era l'uovo, che lo scrivente non aveva potuto ottenere quando osservò la specie nella Dancalia meridionale.

Questa lacuna viene ora riempita dal lavoro del MARA. Riteniamo opportuno trascrivere la descrizione dell'autore in modo che i lettori di questa rivista possano avere sott'occhio la descrizione originale di tutti gli stadi della specie.

« Le uova di *A. dancalicus*, a qualche ora di distanza dall'ovodeposizione, si presentano di un colorito grigio ferro caratteristico, sul quale risaltano, in maniera abbastanza evidente, le linee chiare delle frange e la struttura verrucosa della faccia superiore.

La *superficie inferiore* dell'uovo appare fortemente convessa in senso trasversale e manifesta una sensibile accentuazione della curva longitudinale all'unione dell'1/4 anteriore con i 3/4 posteriori. La struttura dell'exochorion è quivi minutamente granulare tanto da lasciare apparire il suo aspetto puntiforme, solo osservandola con discreti ingrandimenti.

Le *superfici laterali* dell'uovo fanno seguito a quella inferiore, della quale ripetono, nell'exochorion, la fine struttura granulare. Non si riscontra su queste superfici alcun accenno a formazione di galleggianti, per cui quivi l'exochorion si estende senza modificazioni morfologiche sino alla base d'inserzione della frangia che delimita superiormente le superfici laterali anzidette.

La *superficie superiore* dell'uovo, lievemente convessa in senso trasversale, e lievemente concava in senso longitudinale, resta compresa tra le basi d'inserzione delle due frange ed è caratterizzata dall'esistenza di elementi verrucosi di varia forma e volume sparsamente distribuiti lungo il piano della superficie stessa. Fra gli elementi verrucosi l'exochorion mantiene la solita struttura caratteristica finemente granulare, esistente sulle superfici inferiore e laterali.

Il *polo cefalico*, sensibilmente più voluminoso di quello caudale presenta una formazione mammellonata con quattro tubercoli protrudenti sul piano della superficie superiore, e lungo l'asse longitudinale dell'uovo stesso, sì da conferire a questa estremità dell'uovo un aspetto peduncolato maggiormente visibile osservando le uova in proiezione laterale.

Il *polo caudale*, notevolmente più appuntito, presenta anch'esso quattro tubercoli analoghi a quelli del polo opposto, ma notevolmente meno appariscenti, e non tali da indurre alterazioni nella linea prospettiva generale di questa estremità.

La *frangia*, la cui base di inserzione corrisponde al limite di separazione tra le superfici laterali e quella superiore, si estende lungo tutto l'asse longitudinale dal polo cefalico a quello caudale, senza però giungere a contornare queste due estremità. In coincidenza, infatti, dei due poli (molto più sensibilmente al polo cefalico che a quello caudale) la frangia perdendo progressivamente di altezza si va riducendo a una semplice plica dell'exochorion, a mala pena accennata e più intuibile che visibile con i maggiori ingrandimenti. Lungo tutto lo svolgimento longitudinale della frangia è bene evidenziabile in essa una esilissima striatura diretta normalmente alla linea d'inserzione della stessa. Nelle uova esaminate durante il loro galleggiamento in acqua, gli angoli formati rispettivamente dalla frangia con il piano della superficie superiore e quello formato dalla stessa con il piano delle superfici laterali, in un punto corrispondente alla metà dell'asse longitudinale dell'uovo, presentano un'apertura rispettivamente di 135° e di 150° circa.

Dalla media delle misurazioni rilevate su 717 uova deposte da anofeli catturati in diversi momenti dell'anno si sono ottenuti i seguenti valori: lunghezza media misurata tra i due poli = 523 micron: altezza media massima misurata all'unione del 1/4 cefalico con i 3/4 caudali = 135 micron: larghezza media, senza calcolare le frange = 208 micron: massima altezza della frangia = 20,8 micron ».

A. CORRADETTI

Prof. A. MISSIROLI, *Direttore responsabile*

Soc. An. Poligrafica Italiana Roma - Via della Guardiola, 22